

柚皮素增加自噬抑制泡沫细胞的形成

陈雨露¹, 杜延飞¹, 郑文武¹, 李光², 郑舒展^{1*}

¹西南医科大学附属第一医院 心血管内科; ²西南医科大学心血管研究所, 泸州 646000

摘要:观察柚皮素(naringenin)对THP-1源性泡沫细胞自噬的影响,初步探讨其防治动脉粥样硬化的可能作用机制。首先使用cck8实验检测不同浓度柚皮素对细胞活性的影响。再将不同浓度的柚皮素(0、10、25、50、100 μmol/L)作用于泡沫细胞,Western blot检测泡沫细胞中LC3、p62的表达并检测泡沫细胞的总胆固醇含量。然后将柚皮素与雷帕霉素(rapamycin)、3MA分别作用于泡沫细胞后分析LC3、p62的蛋白表达水平。再将柚皮素、compound C分别处理泡沫细胞检测LC3、p-AMPK、AMPK的蛋白表达水平并检测泡沫细胞的总胆固醇(TC)的含量。结果显示,柚皮素对泡沫细胞活性无毒性影响($P > 0.05$);与模型组相比,柚皮素组LC3II/LC3I比值增加,p62表达减少,总胆固醇含量减少($P < 0.05$);与模型组相比,柚皮素组LC3II/LC3I比值及p-AMPK/AMPK比值增加,总胆固醇含量减少($P < 0.05$)。柚皮素能够上调泡沫细胞的自噬能力,减轻细胞内胆固醇的含量从而抑制泡沫细胞的形成;柚皮素通过增加AMPK的磷酸化水平促进泡沫细胞的自噬能力,这可能是柚皮素防治动脉粥样硬化的分子机制之一。

关键词:柚皮素;泡沫细胞;ox-LDL;自噬;动脉粥样硬化

中图分类号:R966;R543.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)11-1913-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.11.015

Naringenin inhibits the formation of foam cells by promoting the autophagy

CHEN Yu-lu¹, DU Yan-fei¹, ZHENG Wen-wu¹, Li Guang², ZHENG Shu-zhan^{1*}

¹Department of cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

²Cardiovascular Institute of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Observe the effect of naringenin on autophagy of THP-1 foam cells to explore its potential mechanism for the prevention and treatment of atherosclerosis. First of all, CCK8 experiment was used to test the effect of naringenin on cell viability at different concentrations. In the next steps, different concentrations of naringenin (0, 10, 25, 50, 100 μmol/L) were applied to foam cells, and Western blot was used to detect the expression of LC3, p62 and the content of total cholesterol in foam cells. Naringenin, rapamycin and 3MA were applied to foam cells respectively to analyze the protein expression levels of LC3 and p62 later. Ox-LDL, naringenin and compound C were applied to macrophages respectively to analyze the protein expression levels of LC3, p-AMPK, AMPK and the content of total cholesterol finally. The results showed as follows: Naringenin had no toxic effect on foam cells activity ($P > 0.05$); Compared the naringenin group with the model group, the ratio of LC3II/LC3I was increased ($P < 0.05$), and the expression of P62 was reduced ($P < 0.05$), the content of total cholesterol was reduced otherwise ($P < 0.05$); Compared the naringenin group with the model group, the ratio of LC3II/LC3I and the ratio of P-AMPK/AMPK were increased ($P < 0.05$), and the content of total cholesterol was reduced ($P < 0.05$). Naringenin could up-regulate the autophagy ability of foam cells, and reduce the content of total cholesterol in the cells to inhibit the formation of foam cells. Naringenin promoted the autophagy ability of foam cells by increasing the level of AMPK phosphorylation, which might be one of the molecular mechanisms of naringenin in preventing and treating atherosclerosis.

Key words: naringenin; foam cells; ox-LDL; autophagy; atherosclerosis

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性动脉疾病,影

响动脉内中外三层膜的功能,它的特征是动脉壁上的内膜斑块的增厚和胆固醇的堆积^[1]。动脉粥样硬化所致的心血管疾病在西方国家中占有很高的致死率^[2]。泡沫细胞的形成在动脉粥样硬化的发生发展中起到了关键性作用,是动脉粥样硬化斑块内

收稿日期:2019-12-23 接受日期:2020-10-23

基金项目:四川省医学会基金(2016SHD004);泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2017LZXNYD-J03)

*通信作者 E-mail: toshuzhan@126.com

出现的特征性病理细胞^[3],主要是由单核细胞分化的巨噬细胞吞噬大量氧化修饰的低密度脂蛋白形成,其分泌多种炎症因子及基质代谢酶可诱导血管平滑肌细胞凋亡,破坏纤维的胶原成分,导致粥样斑块不稳定和急性心血管事件的发生^[4,5]。自噬是细胞器及蛋白质聚集体等细胞质组分通过溶酶体装置分解和回收的机制。自噬维持细胞代谢平衡及内环境稳定,是一种细胞修复过程,自噬功能的缺陷可促进动脉粥样硬化的发生^[6,7]。柚皮素是天然的黄酮类化合物,对动脉粥样硬化具有保护作用^[8],其作用机制有待进一步明确。本研究观察柚皮素对泡沫细胞形成的影响以及探讨是否通过自噬途径发挥作用,为其防治动脉粥样硬化的临床应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养

细胞株 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell line, THP-1) (武汉普诺赛生命科技有限公司); RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司);青链霉素 (中国碧云天公司)。

1.1.2 试剂

柚皮素 (naringenin) (中国思域化工); PMA、3MA (美国 Sigma 公司); 氧化低密度脂蛋白 ox-LDL (广州奕源生物科技有限公司); cck-8 试剂盒 (中国碧云天公司); 雷帕霉素 (rapamycin, Rapa) (美国 MedChemExpress 公司); compound C、饱和油红 O 染色液 (中国索莱宝公司); LC3、SQSTM1/p62、AMPK、p-AMPK 抗体 (美国 CST 公司); HRP 标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗 (上海斯信生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器

Heracell 150i CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo scientific 公司); Infinite M200 全自动酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); IX71-F22PH 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); SW-CJ-2G 型超净工作台 (苏州净化公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Sim-140 制冰机 (日本 SANYO 公司); BS224S 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 方法

1.2.1 泡沫细胞模型的构建及分组

使用含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基培养 THP-1 细胞于 CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中,在 37 °C 条件下培养至对数生长期,然后用 160 nmol/L PMA 的无血清培养基诱导 48 h,使其成为

THP-1 源性的巨噬细胞。再将得到的巨噬细胞用 50 μg/mL ox-LDL 3% FBS 培养基培养 72 h 成为泡沫细胞。本实验共分为 3 个组,第 1 组为:空白对照组 (不加入任何干预药物),模型组 (加入 50 μg/mL ox-LDL),不同浓度的柚皮素组 (50 μg/mL ox-LDL + 10、25、50、100 μmol/L 柚皮素);第 2 组为:空白对照组,模型组,柚皮素组 (50 μg/mL ox-LDL + 100 μmol/L 柚皮素),雷帕霉素组 (50 μg/mL ox-LDL + 100 nmol/L 雷帕霉素),3MA 组 (50 μg/mL ox-LDL + 5 mmol/L 3MA);第 3 组为:为空白对照组,模型组,柚皮素组,compound C 组 (50 μg/mL ox-LDL + 10 μmol/L AMPK 拮抗剂 compound C),柚皮素与 compound C 共处理组 (50 μg/mL ox-LDL + 10 μmol/L compound C + 100 μmol/L 柚皮素)。

1.2.2 细胞活性检测

将正处于对数生长期的 THP-1 细胞与 160 nmol/L PMA 的无血清培养基配制成浓度为 1 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,再按照每孔 10⁴ 个细胞接种于 96 孔板,安置于培养箱中培养 48 h,再按照 CCK-8 试剂盒说明书操作,加入不同浓度的柚皮素 (0、5、10、25、50、100 μmol/L),用酶标仪测定 490 nm 波长下的光吸收值。

1.2.3 油红 O 染色

用上述方法将 THP-1 细胞源性巨噬细胞配置成浓度为 5 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,按照每个孔 10⁶ 个细胞均匀接种于 6 孔板中,分为 2 组,按照上述空白对照组及模型组处理后,用 PBS 漂洗 3 次,再用 4% 多聚甲醛在 37 °C 固定 15 min,用 PBS 漂洗 2 次,油红 O 染色 25 min,60% 异丙醇漂洗 5 s,再用 PBS 漂洗 3 次。显微镜下观察,按文献所述:胞内较大红染颗粒 ≥ 5 个即可判定为泡沫细胞^[9]。

1.2.4 Western blot (蛋白质免疫印迹法)

收集上述分组处理好的细胞,加入细胞裂解液提取总蛋白,并采用 BCA 法测蛋白浓度。分别使用 10%、12% 分离胶进行凝胶电泳 (SDS-PAGE),每孔上样量为 20 μg,按照浓缩胶 70 V,分离胶 110 V 进行恒压电泳,切取需要的胶带,400 mA 恒流转至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,将一抗按 1:1 000 比例稀释后于 4 °C 孵育过夜,次日用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,后用 HRP 标记的羊抗兔或者羊抗鼠二抗 (1:2 000) 于室温孵育 2 h,再加 TBST 摇床洗膜 3 次,每次 10 min,使用化学发光法显影,拍照保存进行分析,使用 Quantity One 图像分析软

件分析条带,分析目的蛋白的表达水平。

1.2.5 细胞内总胆固醇含量的测定

将收集的细胞制成悬液后用 1 000 rpm 离心 10 min, 去掉上清液, 收集细胞样本后使用超声波破碎细胞以获得匀浆液, 再按照总胆固醇测定试剂盒说明书测定细胞内总胆固醇含量(TC)。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计学软件、GraphPad Prism 8

进行所有数据分析和作图, 计数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泡沫细胞模型的建立

油红 O 染色结果如图 1。结果表明: 空白对照组与模型组相比较, 模型组细胞内有大量红染脂滴颗粒, 且胞内较大红染颗粒 ≥ 5 个, 细胞模型成功建立。

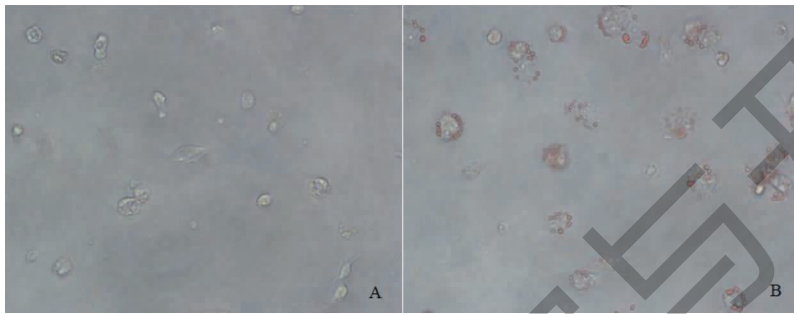


图 1 泡沫细胞模型的建立(油红 O 染色, $\times 400$)

Fig. 1 Establishment of foam cell model (oil red O staining, $\times 400$)

注: A: 空白对照组; B: 模型组(ox-LDL 50 $\mu\text{mol/L}$)。Note: A: Control group; B: Model group (ox-LDL 50 $\mu\text{mol/L}$)。

2.2 不同浓度的柚皮素对细胞的毒性影响

使用 CCK-8 试剂盒测定不同浓度的柚皮素对细胞的活性影响以排除其毒性影响。结果见图 2, 细胞活力 = [(加药细胞 OD - 空白 OD) / (对照细胞 OD - 空白 OD)] $\times 100\%$, 结果表明, 当柚皮素浓度大于等于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 柚皮素对细胞活性无毒性影响, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

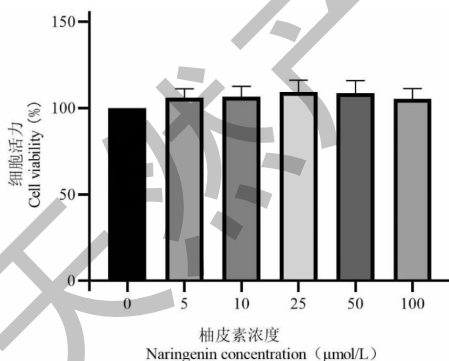


图 2 柚皮素对细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of naringenin on cell activity

注: 与空白对照组相比, $P > 0.05$ 。Note: Compared with control, $P > 0.05$ 。

2.3 柚皮素对泡沫细胞自噬相关蛋白表达的影响

2.3.1 不同浓度的柚皮素对泡沫细胞自噬的影响

如图 3 所示, 与空白对照组相比, 模型组 LC3II/LC3I 比值降低, p62 升高($P < 0.05$); 随着柚皮素浓

度的增加, 25 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度的柚皮素增加泡沫细胞的自噬水平, 主要表现为 LC3II/LC3I 比值增加, P62 蛋白水平降低, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时作用最明显($P < 0.05$), 故选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素为使用浓度。

2.3.2 不同浓度柚皮素对泡沫细胞总胆固醇含量的影响

如图 4 所示, 与空白对照组相比, 模型组的细胞内总胆固醇含量高($P < 0.05$), 随着柚皮素浓度增加, 泡沫细胞内胆固醇含量逐渐降低, 在柚皮素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时最低($P < 0.05$)。

2.3.3 柚皮素对泡沫细胞自噬的影响

如图 5 所示, 与空白对照组相比, 模型组的 LC3II/LC3I 的比值降低, P62 蛋白的表达水平升高($P < 0.05$), 自噬水平降低; 与模型组相比较, 柚皮素组与 Rapa 组的 LC3II/LC3I 的比值都增加, 3MA 组比模型组的 LC3II/LC3I 的比值降低($P < 0.05$); 柚皮素组与 Rapa 组相比, LC3II/LC3I 的比值更高, 并且 P62 表达水平较模型组降低($P < 0.05$)。

2.4 柚皮素对泡沫细胞自噬影响的机制探讨

如图 6 所示, 实验结果表明, 与空白对照组相比较, 模型组 p-AMPK/AMPK 与 LC3II/LC3I 比值均降低, 与模型组相比, 柚皮素组 p-AMPK/AMPK 比值

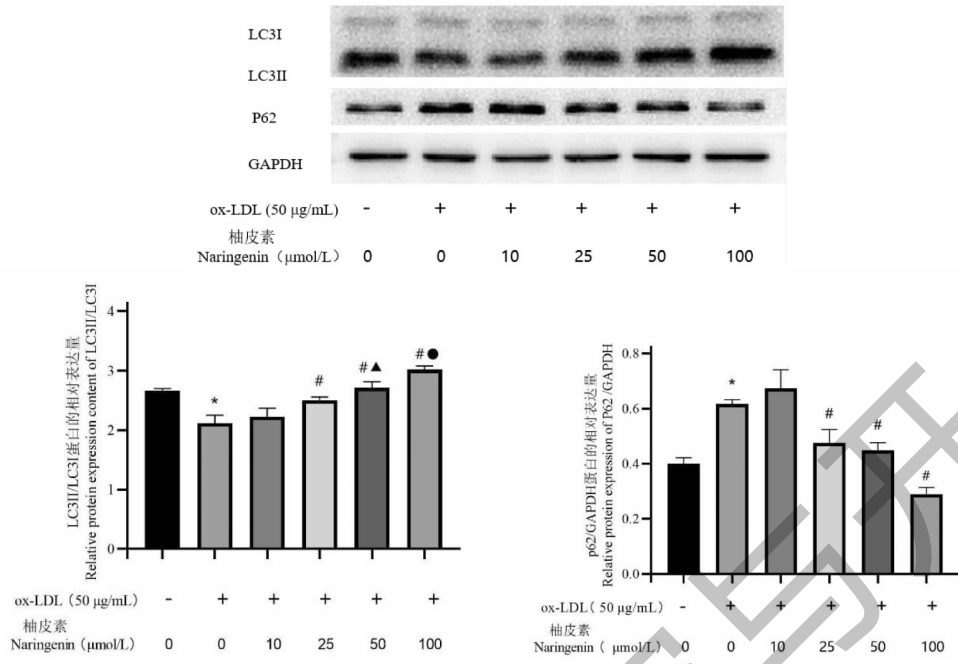


图3 不同浓度的柚皮素对泡沫细胞自噬的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of naringenin on autophagy of foam cells

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compared with model, # $P < 0.05$ 。

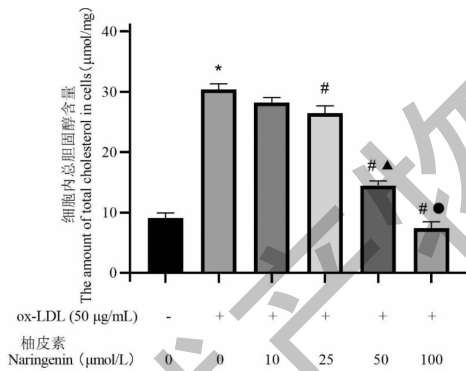


图4 不同浓度柚皮素对泡沫细胞胆固醇含量的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of naringenin on cholesterol content in foam cells

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compared with model, # $P < 0.05$ 。

与 LC3II/LC3I 比值均升高 ($P < 0.05$); compound C 组与 compound C + 柚皮素共处理组结果一致,与模型组相比 p-AMPK/AMPK 与 LC3II/LC3I 比值均降低 ($P < 0.05$)。

2.5 柚皮素对泡沫细胞胆固醇含量的影响

如图7所示,模型组比空白对照组的总胆固醇含量增多,而柚皮素组比模型组显著减少 ($P < 0.05$); compound C 组与 compound C + 柚皮素共处

理组结果一致,均为与模型组相比,总胆固醇含量增多 ($P < 0.05$)。

3 讨论

动脉粥样硬化是在动脉硬化的血管病中最常见的一种,是由多种病因,多种因素作用于不同环节产生,在心血管疾病中,有着很高的死亡率^[10]。动脉粥样硬化的发病机制尚未完全确定,但巨噬细胞相关胆固醇代谢异常是主要原因之一,动脉内膜受损,巨噬细胞吞噬氧化低密度脂蛋白形成泡沫细胞是动脉粥样硬化的起点^[11]。

自噬是一种保守的分解代谢过程,在多种疾病的多种细胞过程中发挥重要作用,可将细胞内的蛋白质和细胞器传递到溶酶体进行降解和循环^[12],对维持细胞内环境的稳定至关重要。过度的自噬已被证明是致病的,许多研究报道了自噬在冠心病中发生的意义,自噬可能在冠心病患者血清白蛋白降低的相关心血管事件中发挥作用;自噬对冠心病患者的巨噬细胞内低密度脂蛋白的降解有保护作用^[13-15]。但自噬在动脉粥样硬化中的具体作用机制尚不明确。研究表明,自噬延缓了动脉粥样硬化的进程,但是有缺陷的自噬加快了动脉粥样硬化的进程^[16,17]。

柚皮素是天然的黄酮类化合物,主要存在于葡

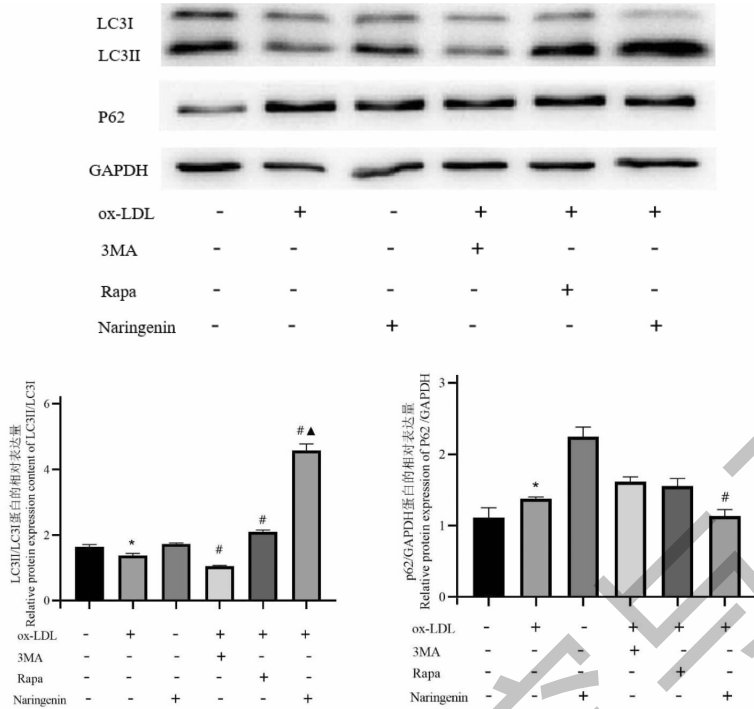


图5 柚皮素促进泡沫细胞自噬

Fig.5 Naringenin promotes autophagy of foam cells

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与 Rapa 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compared with model, # $P < 0.05$; Compared with Rapa, ▲ $P < 0.05$ 。

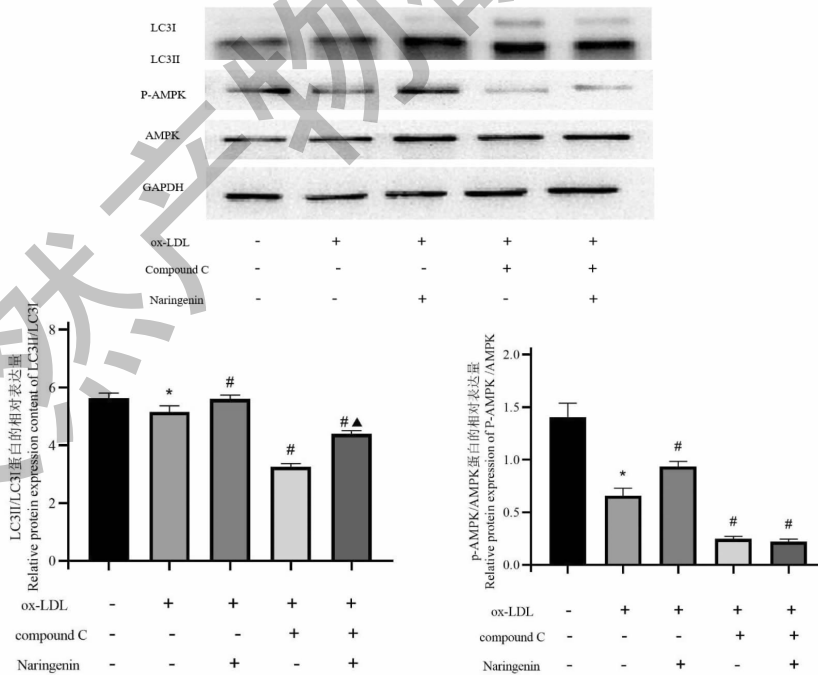


图6 柚皮素对泡沫细胞自噬影响的机制探讨

Fig.6 Mechanism of effect of naringenin on autophagy of foam cells

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compared with model, # $P < 0.05$ 。

萄柚和橙子中,它的结构与广泛研究的多酚白藜芦醇相似,具有潜在的健康益处^[18],有研究表明,柚皮素具有抗动脉粥样硬化作用^[19],柚皮素可以增加 THP-1 源性巨噬细胞的胆固醇外排^[20]。但柚皮素防治动脉粥样硬化的具体机制仍需进一步研究,鉴于黄酮类化合物可能有促进自噬活性的作用^[21,22],我们推测,柚皮素可能通过增加自噬来减轻粥样硬化斑块病变,从而对动脉粥样硬化起保护作用。本研究结果表明,泡沫细胞的形成伴有自噬能力的受损,表现为 LC3II/LC3I 比值降低, P62 水平升高。25 μM 以上浓度的柚皮素呈浓度依赖性的增加巨噬细胞自噬流水平,在 100 μM 作用最强。与自噬增强剂雷帕霉素相比,柚皮素升高 LC3II 的作用更明显。同时 25 μM 以上浓度的柚皮素浓度依耐性地降低巨噬细胞内总胆固醇的含量,抑制泡沫细胞的形成。

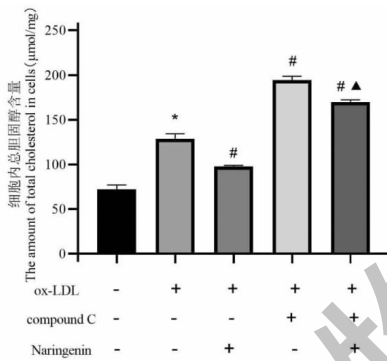


图7 柚皮素对泡沫细胞胆固醇含量的影响

Fig. 7 Effect of naringenin on cholesterol content of foam cells

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compared with model, # $P < 0.05$.

为进一步探讨柚皮素促进巨噬细胞自噬的机制,我们选择自噬通路的调节因子 AMPK 作为观察指标。AMPK 是细胞能量代谢的传感器,调节细胞代谢以维持能量稳态,包括脂质代谢,并通过 ULK-1 激活自噬,并且促进自噬^[23]。Wu 等^[24]研究发现丹皮酚通过上调自噬和激活 AMPK 磷酸化来达到抗动脉粥样硬化的作用,还有相关文献报道,黄连素可以通过激活 AMPK/mTOR 信号通路诱导的自噬来预防动脉粥样硬化^[25],而且 morin 可通过激活 HU-VECs 中的 AMPK 信号通路,诱导自噬,从而减轻 ox-LDL 介导的损伤^[26]。本研究结果显示,AMPK 抑制剂 compound C 可降低磷酸化 AMPK 的水平,降低 LC3II/LC3I 的比值;增加泡沫细胞内胆固醇的含

量。说明 AMPK 可能通过影响自噬参与巨噬细胞内胆固醇含量的调节。而柚皮素能够增加泡沫细胞内磷酸化 AMPK 的水平,促进自噬。另外,将柚皮素处理的泡沫细胞预防性加入 AMPK 抑制剂 compound C, compound C 抑制了柚皮素对泡沫细胞的降胆固醇作用。说明柚皮素通过增加 AMPK 磷酸化而促进自噬。

综上,柚皮素的抗动脉粥样硬化作用可能与其增加泡沫细胞的自噬有关,柚皮素可通过增加 AMPK 磷酸化水平促进自噬,进而抑制动脉粥样硬化中泡沫细胞的形成,延缓动脉粥样硬化的发生与发展。

参考文献

- Milutinović A, Šuput D. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 4 (1) : 3-20.
- Libby P, Bornfeldt KE. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. *Circ Res*, 2016, 11 : 531-534.
- Tabas I. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 11 : 653-667.
- Weiss-Sadan T, Maimoun D, Oelschlagel D, et al. Cathepsins drive anti-inflammatory activity by regulating autophagy and mitochondrial dynamics in macrophage foam cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 5 : 550-572.
- McArdle S, Buscher K, Ghosheh Y, et al. Migratory and dancing macrophage subsets in atherosclerotic lesions [J]. *Circ Res*, 2019, 10 (1) : 16-21.
- Chang C, Young LN, Morris KL, et al. Bidirectional control of autophagy by BECN1 BARA domain dynamics [J]. *Mol Cell*, 2019, 7 : 339-353.
- Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. *Cell Metab*, 2012, 1 : 534-544.
- Orhan IE, Nabavi SF, Daglia M, et al. Naringenin and atherosclerosis: a review of literature [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 1 : 245-251.
- Fogelman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1980, 77 : 2214-2218.
- Zhou M, Ren P, Zhang Y, et al. Shen-Yuan-Dan capsule attenuates atherosclerosis and foam cell formation by enhancing autophagy and inhibiting the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10 : 603.

- 11 Shao D, Lian Z, Di Y, et al. Dietary compounds have potential in controlling atherosclerosis by modulating macrophage cholesterol metabolism and inflammation via miRNA [J]. *NPJ Sci Food*, 2018, 2(1): 1-3.
- 12 Khawar MB, Gao H. Autophagy and lipid metabolism [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 12: 359-374.
- 13 Zhu Y, Yang T, Duan J, et al. MALAT1/miR-15b-5p/MAPK1 mediates endothelial progenitor cells autophagy and affects coronary atherosclerotic heart disease via mTOR signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 1089-1109.
- 14 Wu Y, Fan W, Huang D. Possible intermediary role of autophagy in serum albumin decrease-associated cardiovascular events among patients with coronary heart disease [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 2(1): 50-64.
- 15 Khalil H, Abd El Maksoud AI, Alian A, et al. Interruption of autophagosome formation in cardiovascular disease, an evidence for protective response of autophagy [J]. *Immunol Invest*, 2019, 3(2): 1-15.
- 16 Masuyama A, Mita T, Azuma K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances atherosclerotic plaque instability [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 5: 1141-1147.
- 17 Xiong Y, Yepuri G, Forbitech M, et al. ARG2 impairs endothelial autophagy through regulation of MTOR and PRKAA/AMPK signaling in advanced atherosclerosis [J]. *Autophagy*, 2014, 10: 2223-2238.
- 18 Burke AC, Telford DE, Edwards JY, et al. Naringenin supplementation to a chow diet enhances energy expenditure and fatty acid oxidation, and reduces adiposity in lean, Pair-Fed Ldlr mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 6(3): 80-83.
- 19 Burke AC, Sutherland BG, Telford DE, et al. Naringenin enhances the regression of atherosclerosis induced by a chow diet in Ldlr mice [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 2(6): 60-70.
- 20 Saenz J, Santa-María C, Reyes-Quiroz ME, et al. Grapefruit flavonoid naringenin regulates the expression of LXR α in THP-1 macrophages by modulating AMP-Activated protein kinase [J]. *Mol Pharm*, 2018, 1: 1735-1745.
- 21 Janda E, Salerno R, Martino C, et al. Qualitative and quantitative analysis of the proautophagic activity of citrus flavonoids from bergamot polyphenol fraction [J]. *Data Brief*, 2018, 1: 1327-1334.
- 22 Gordon PB, Holen I. Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid [J]. *J Biol Chem* 1995, 2: 5830-5838.
- 23 Kim SH, Yu HS, Park S, et al. Electroconvulsive seizures induce autophagy by activating the AMPK signaling pathway in the rat frontal cortex [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2019, 11(1): 3-6.
- 24 Wu H, Song A, Hu W. The anti-atherosclerotic effect of paeonol against vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulation of autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(1): 9-18.
- 25 Fan X, Wang J, Hou J, et al. Berberine alleviates ox-LDL induced inflammatory factors by up-regulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *J Transl Med*, 2015, 1(3): 9-12.
- 26 Zhang X, Han X, Zhang P, et al. Morin attenuates oxidized low-density lipoprotein-mediated injury by inducing autophagy via activating AMPK signalling in HUVECs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 4: 1053-1060.

(上接第 1942 页)

- 17 Choi JH, Lee HJ, Kim S. Purification and antithrombotic activity of wulfase, a fibrinolytic enzyme from the fruit bodies of the edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf. ex. Fr. [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2016, 52: 608-614.
- 18 Mi Y, Dong C, Hou ZX, et al. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme from a marine *Streptomyces* strain [J]. *Chin J Mar Drugs (中国海洋药物)*, 2016, 35(3): 43-48.
- 19 Xin X, Ambati RR, Cai ZW, et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from a bacterium isolated from soil [J]. *3 Biotech*, 2018, 8: 90.
- 20 Kumar D, Banerjee D. Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: past, present, and future [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 469: 150-160.